

# Badanie aktywności enzymów wątrobowych u krów mlecznych w powiązaniu z wybranymi wskaźnikami gospodarki lipidowej

Zakład Profilaktyki Niepłodności Instytutu Weterynarii ul. Poznańska 35, 62-020 Swarzędz

## Summary

**Studies on the activity of selected hepatic enzymes in dairy cows in conjunction with lipid metabolism markers**

The aim of the study was to determine the influence of disturbed lipid metabolism in dairy cows on the functional condition of the liver. The laboratory investigations have been performed on 48 black-white breed cows divided into four groups: 4 and 2 weeks before parturition and 1-2 and 5 weeks after delivery. In spite of the markers of fat metabolism (NEFA, TG and total cholesterol), it has been possible to determine the activity of GGTP, LDH and AspAT.

The results indicate an impairment in the liver function during disturbed lipid metabolism in cows. The changes had a subclinical character and were more pronounced after parturition. The activity of hepatic enzymes, particularly GGTP, is useful for diagnosis of subclinical disturbances of liver functions in the course of lipid metabolism disturbances. The enzyme activity should be analysed together with fat metabolism markers mainly with a concentration of NEFA.

Początek laktacji stanowi u krów okres gwałtownego przyspieszenia metabolizmu kosztem osłabienia mechanizmów jego regulacji. Hormonalne przestawienie przemiany ustrojowej w tym okresie oraz gwałtowny wzrost zapotrzebowania na energię i składniki niezbędne do produkcji mleka sprawiają, że u wysoko wydajnych krów mlecznych może dochodzić do zaburzeń czynnościowych lub nieodwracalnych zmian strukturalnych w narządach układu trawiennego, w tym głównie w wątrobie (5, 6, 13). Badania wielu autorów potwierdziły występowanie u około 60% krów zmian zwyrodnieniowych w tym narządzie o charakterze stłuszczenia (7, 11, 13, 14). Schorzenie rozwija się przy podwyższonym poziomie wolnych kwasów tłuszczowych we krwi oraz obniżonej sekrecji lipoprotein, warunkujących usuwanie resyntetyzowanych w wątrobie trójglicerydów (8). W bezobjawowym przebiegu schorzenia organizm uruchamia mechanizmy obronne w postaci zahamowania owulacji lub obumierania zarodków, prowadząc do ograniczenia rozrodczości (1, 2, 4, 10). Niezależnie od powikłań rozwijającego się zespołu chorobowego, bezspornym pozostaje fakt, że proces odkładania tłuszczu w wątrobie narusza prawidłowość funkcji tego narządu, mogąc w konsekwencji prowadzić do załamania homeostazy ustrojowej i śmierci zwierzęcia.

Celem podjętych badań była analiza aktywności enzymów wątrobowych w powiązaniu z wybranymi wskaźnikami przemiany tłuszczowej u krów mlecznych.

## Materiał i metody

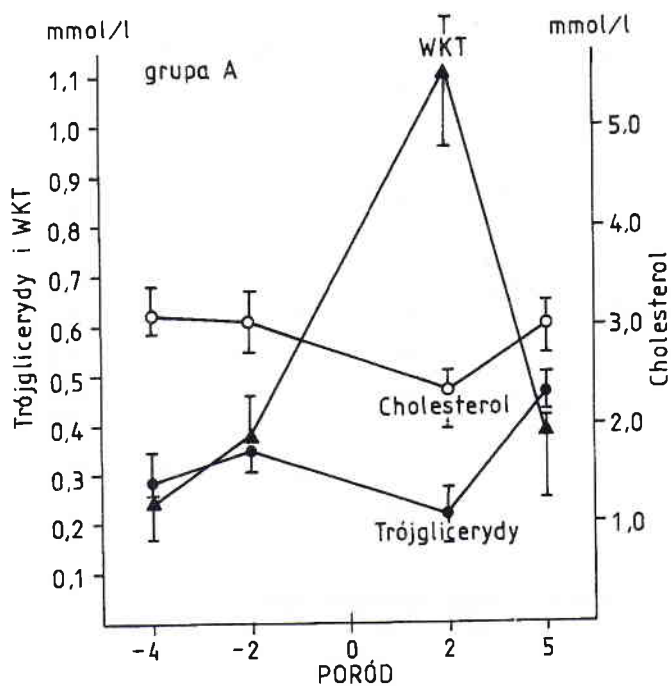
Badaniem objęto 48 krów rasy czarno-białej z 90% dolewem krwi HF, w wieku 4-8 lat, klinicznie zdrowych, pochodzących z czterech gospodarstw woj. poznańskiego. Wszystkie zwierzęta utrzymywano w warunkach chowu alkierzowego, na stanowiskach uwięziowych. W okresie badań dzienną dawkę żywnościową stanowiło 20 kg kisonki z kukurydzy, 15 kg kisonki z liści buraczanych oraz 3 kg słomy jęczmiennej. W formie uzupełnienia zwierzętom podawano macerat sporządzony z plew pszennych, wywaru żytniego, melasy i mieszanki 02, którego 1 kg zawierał 29,5 białka ogólnego oraz 34,0 suchej masy i posiadał wartość energetyczną 0,451 j.o. Ponadto przez cały rok krowy otrzymywały lizawkę lub Polfamix M oraz paszę treściwą, podawaną indywidualnie, w postaci mieszanki B w ilości 3,5-9,5 kg w zależności od wydajności mleka, która wynosiła średnio w obiekcie A 6 tys., B 5, C 4 i D 3-3,5 tys. kg mleka rocznie. W okresie zasuszenia dawka paszy treściwej wynosiła 1 kg w 3 m-cu przed wycieleniem, 2 w drugim i 3 kg w ostatnim miesiącu ciąży.

Krew do badań pobierano czterokrotnie, w 4 i 2 tygodniu przed porodem - badanie 1 i 2 oraz 1-2 i 5 tygodniu laktacji - badanie 3 i 4. Przeprowadzone badania biochemiczne obejmowały oznaczenie stężenia cholesterolu całkowitego, trójglicerydów (TG), aktywności aminotransferazy asparaginianowej (AspAT), gamma-glutamylotransferazy (GGTP) i dehydrogenazy mleczanowej (LDH), metodami enzymatycznymi oraz poziomu wolnych kwasów tłuszczowych (WKT) metodą kolorymetryczną według Duncombe (3).

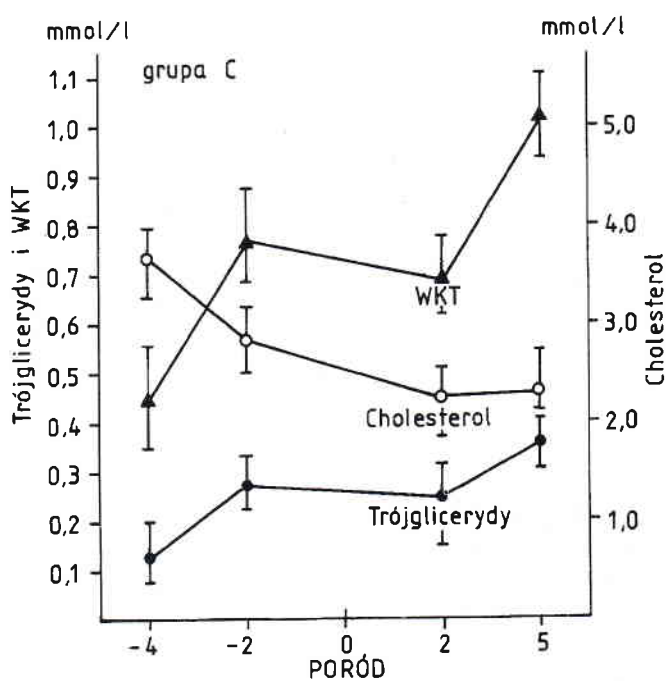
Oznaczenia enzymatyczne wykonano przy użyciu gotowych zestawów diagnostycznych „Biochemtest” i POCH „Diagnostic” produkcji polskiej. Wyniki badań laboratoryjnych poddano analizie statystycznej przy użyciu testu t-Studenta.

## Wyniki i omówienie

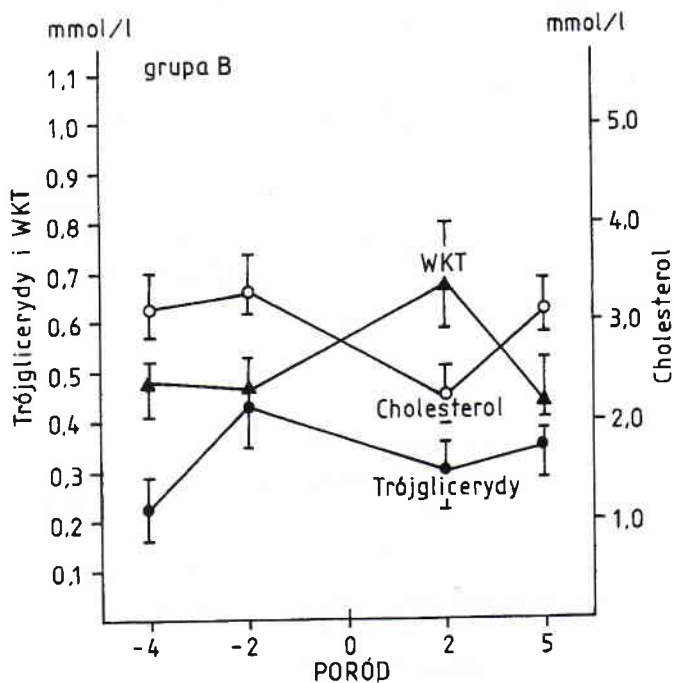
Uzyskane wyniki badań biochemicznych krwi w zakresie gospodarki lipidowej wskazują na zachwianie ustrojowej przemiany tłuszczowej u krów w okresie okołoporodowym, objawiające się po porodzie gwałtownym wzrostem stężenia WKT oraz obniżeniem poziomu trójglicerydów i cholesterolu we krwi (ryc. 1, 2, 3 i 4). W zakresie stężenia WKT u wszystkich zwierząt obserwowano w tym okresie wzrost wartości tego parametru średnio z 0,19-0,48 mmol/l w badaniu 1, do 0,60-1,10 mmol/l w badaniu 3. Poziom trójglicerydów u wszystkich badanych zwierząt ulegał niewielkiemu podwyższeniu w ostatnim okresie ciąży (badanie 2), a następnie obniżeniu, wykazując w badaniu 4. ponownie tendencję wzrostową. Wartość tego parametru w badaniu drugim mieściła się w granicach 0,27-0,66, w 3. 0,22-0,30 i 4. 0,35-0,65 mmol/l. Zmianom tym towarzyszyło obniżenie poziomu cholesterolu całkowitego w 1-2 tygodniu po porodzie, średnio do 2,23-2,45 mmol/l w porównaniu z wartościami tego parametru, uzyskanymi w poszczególnych grupach, w czasie kolejnych badań. Stwierdzone zmiany w zakresie gospodarki lipidowej były najwyraźniej zaznaczone w grupie A, tj. u



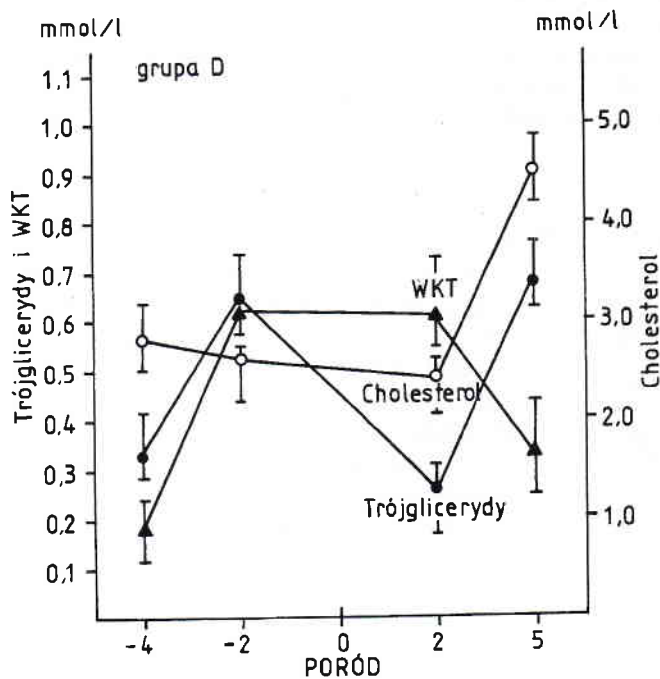
Ryc. 1. Poziom lipidów krwi w czwartym i drugim tyg. przed porodem oraz drugim i piątym tygodniu laktacji



Ryc. 3. Objasnienia jak w ryc. 1



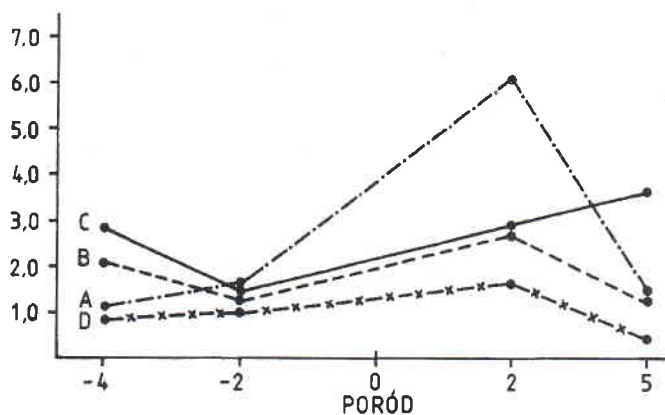
Ryc. 2. Objasnienia jak w ryc. 1



Ryc. 4. Objasnienia jak w ryc. 1

krów, u których potrzeby energetyczne były największe, w związku z najwyższą wydajnością mleka. Odbiciem tego było również największe u tych zwierząt zwiększenie wartości WKT/TG (ryc. 5). Obniżenie poziomu trójglicerydów i cholesterolu, z równoczesnym wzrostem wartości tego ilorazu, uznawane jest przez większość autorów jako charakterystyczny objaw w przebiegu zaburzeń o charakterze zespołu stłuszczenia u krów (5, 7, 9, 16).

Odwierciedleniem stanu czynnościowego wątroby w przebiegu stwierdzonych zaburzeń przemiany tłuszczowej było zachowanie się oznaczanych enzymów wątrobowych (tab. 1). Ubaldi (17) uważa oznaczanie LDH u krów w czasie ciąży i laktacji jako przydatne w wykrywaniu zaburzeń przemiany tłuszczowej o różnym stopniu nasilenia. W badaniach własnych aktywność tego enzymu była zmienna, przy czym najwyższe wartości zanotowano u krów grupy A, u których



Ryc. 5. Wartość ilorazu WKT/TG u krów grupy A, B, C i D, w ostatnim m-cu przed porodem oraz w pierwszych 5-tu tygodniach laktacji

zaburzenie przemiany tłuszczowej było najwyraźniej zaznaczone. Ze względu na zjawisko izoenzymii większość autorów podziela pogląd, iż większą swoistością wątrobową charakteryzuje się GGTP, której zmiana aktywności w surowicy najczulej odzwierciedla stopień stłuszczenia tego narządu (5, 6, 18). Znalazło to potwierdzenie w wynikach badań własnych, gdzie wzrost aktywności GGTP po porodzie, stwierdzony u krów grupy A, korelował ze zmianami w zakresie wskaźników przemiany tłuszczowej. U zwierząt tej grupy zanotowano 1,5-krotny wzrost aktywności tego enzymu w badaniu 3. oraz ponad 2-krotny w 5. tygodniu po porodzie. Pomimo istniejącego zjawiska izoenzymii, z całą pewnością można przyjąć wątrobowe pochodzenie GGTP we krwi, świadczące o głębokim uszkodzeniu struktur komórkowych hepatocytów. Za podobną interpretacją przemawiają wyniki innych autorów (12, 14), którzy udowodnili wątrobowe pochodzenie tego enzymu w przebiegu zaburzenia przemiany lipidowej, połączonego ze stłuszczeniem narządu. W badaniach własnych stwierdzonym zmianom aktywności GGTP towarzyszyła transaminazemia, spowodowana podwyższeniem aktywności AspAT średnio o 80% tuż po porodzie i 40% w 5 tygodniu laktacji. Herdt (10) uważa AspAT jako enzym w pełni odzwierciedlający stopień stłuszczenia wątroby. Większą trudność interpretacji otrzymanych wyników sprawia zachowanie się tego enzymu u pozostałych zwierząt, zwłaszcza w odniesieniu do krów grupy B i C. U zwierząt tych, przy braku zmiany aktywności GGTP w ciągu kolejnych badań, notowano podwyższone wartości AspAT. Można przypuszczać, że stwierdzony brak korelacji w zachowaniu się obu enzymów mógł być spowodowany różnym pochodzeniem oznaczanej AspAT. Wzrost aktywności tego enzymu w surowicy może być wynikiem przenikania do krwi jego frakcji cytoplazmatycznej lub mitochondrialnej. Obie frakcje występują w wątrobie. Wiadomo, że frakcja cytoplazmatyczna AspAT może przenikać do krwi w ostatnim okresie ciąży, w następstwie zmiany przepuszczalności błony komórkowej hepatocytów, spowodowanej w tym okresie obciążeniem przemiany ustrojowej. Zwiększona aktywność tego enzymu we krwi zwykle pojawia się w 6-8 tygodniu przed porodem, po czym może ulegać stopniowemu lub całkowitemu wyeliminowaniu z krwiobiegu w okresie bliskim porodowi (15). Obserwowany w badaniach własnych wzrost aktywności AspAT u krów grupy A po porodzie, występujący równoległe ze wzrostem GGTP, mógł być następstwem uwolnienia frakcji AspAT, związanej z mitochondriami hepatocytów wsku-

Tab. 1. Aktywność enzymów wątrobowych w surowicy

Wskaźnik	Grupa	Kolejne badania			
		1	2	3	4
LDH U/l	A	750	1180*	1087*	883
	B	1025	825	1191*	1136
	C	883	900	951	825
	D	619	771	916	825
AspAT U/l	A	34,6	34,4	60,8*	46,5*
	B	80,9	67,0	71,0	39,3*
	C	62,2	62,3	73,4	72,8
	D	42,3	45,8	50,2	64,7
GGTP U/l	A	20,4	24,1	35,9*	46,6**
	B	25,9	22,9	21,9	24,6
	C	25,4	25,2	24,6	25,0
	D	25,0	28,9	30,9	30,5

Objaśnienia: \* – różnica statystycznie istotna dla  $p \leq 0,05$ , \*\* – różnica statystycznie istotna dla  $p \leq 0,01$ .

tek strukturalnego ich uszkodzenia. Przedstawione zachowanie się AspAT poddaje w wątpliwość przydatność diagnostyczną tego enzymu jako wskaźnika odzwierciedlającego zaburzenia o charakterze zespołu stłuszczenia. Pogląd ten znajduje potwierdzenie w wynikach badań innych autorów. Sokol i wsp. (14) nie stwierdzili jakiegokolwiek zależności pomiędzy stopniem stłuszczenia wątroby i aktywnością AspAT, natomiast Reid i wsp. (13) zalecają oznaczanie aktywności tego enzymu jako przydatne w rozpoznawaniu stłuszczenia wątroby jedynie przy proporcjonalnym wzroście WKT oraz obniżeniu poziomu glukozy.

Przedstawione wyniki badań biochemicznych krwi wskazują na upośledzenie czynności wątroby w stanie zaburzonej gospodarki lipidowej u krów. Zmiany te, przy znacznym nasileniu, mogą prowadzić do uszkodzenia hepatocytów. Stwierdzone zaburzenia miały charakter podkliniczny i były bardziej zaznaczone u krów po porodzie.

### Wnioski

1. U wysoko wydajnych krów mlecznych w końcowym okresie ciąży dochodzi do zaburzenia przemiany tłuszczowej, a następnie po porodzie do naruszenia czynności wątroby.

2. Wybrane enzymy wątrobowe, a zwłaszcza GGTP, są przydatne w wykrywaniu podklinicznych zaburzeń czynności wątroby w przebiegu zakłóconej gospodarki lipidowej, przy czym winny być one analizowane łącznie ze wskaźnikami przemiany tłuszczowej, w tym głównie stężeniem wolnych kwasów tłuszczowych.

### Piśmiennictwo

1. Bitman J., Wood D.L., Lefcourt A.M.: J. Dairy Sci. 73, 948, 1990.
2. Cook D.L., Smith C.A., Parfet J.R., Youngquist R.S., Brown E.M., Garverick H.A.: J. Reprod. Fert. 90, 37, 1990.
3. Duncombe W.G.: Clin. Chem. Acta 9, 122, 1964.
4. Grummer R.R., Berties S.J., Laccount D.W., Snow J.A., Dentina M.R.: J. Dairy Sci. 73, 1537, 1990.
5. Herdt T.H.: Vet. clin. North Am.: Food Animal Practice 4, 213, 1988.
6. Herdt T.H.: Vet. clin. North Am.: Food Animal Practice 4, 269, 1988.
7. Holtenius P.: B. Acta vet. scand. 30, 441, 1989.
8. Holtenius P.: Mh. Vet. Med. 46, 795, 1991.

9. Kuleta Z. *at all*: Acta Acad. Agricult. Techn. Olst. Veterinaria 19, 214, 1990.
10. Laflamme L.F., Connor M.L.: Can. J. Anim. Sci. 72, 843, 1992.
11. Markusfeld O., Nahari N., Adler H.: Isr. J. Vet. Med. 44, 176, 1988.
12. Paulova J., Janečková L., Novotný L., Kmošták S., Čechova J.: Biol. chem. Vet. (Praha) 26, 457, 1990.
13. Reid J.M., Dew S.M., Collins R.A.: J. agric. Sci. Camb. 101, 499, 1983.
14. Sokol J., Reichel P., Vrzgula L.: Biol. chem. Vet. (Praha) 24, 531, 1988.
15. Sommer H.: Vet. Med. Rev. 1, 13, 1975.
16. Staples C.R., Thatcher W.W., Clark J.H.: J. Dairy Sci. 73, 938, 1990.
17. Ubaldi A., Sabatini A.P., Corbella E.: Proceedings of The 2-nd International Symposium of Vet. Lab. Diagnosticians, Lucerna 1980 s. 478.
18. Yasuda J., Syuto B., Kimehiko T., Ohfujii S.: Jpn J. Vet. Sci. 51, 733, 1989.

Adresa autora: dr Michał Bronicki, Os. Wichrowe Wzgórze 36i/82, 61-699 Poznań

GRAŻYNA PAPROCKA, ANDRZEJ KĘSY, WIESŁAW NIEDBALSKI, ANDRZEJ FITZNER

## Przydatność jednowarstwowych hodowli komórek do wykrywania wirusa pryszczycy

Zakład Badania Pryszczycy Instytutu Weterynarii, ul. Wodna 7, 98-220 Zduńska Wola

### Summary

#### Usefulness of cell lines for the detection of foot and mouth disease virus

The growth power of different cell lines: calf kidney, heart fibroblasts, thymus and foetal testicles, as well as porcine kidney in 17 types of media prepared on the basis of Hanks, Eagle's and Parker's media were studied. The conditions for the preparation of cell suspensions for deep freeze storage and the optimal conditions for cell growth after thawing were determined. The titers and intensity of CPE of FMD virus, type A, O and C, propagated in cell cultures obtained directly after trypsinization and after 6 months of storing the cells in liquid nitrogen ( $-196^{\circ}\text{C}$ ), were similar in calf kidney cells, pig kidney cells and calf thyroid cells. No cytopathic effects were observed in cultures of calf heart and foetal calf testicles infected with FMDV type A, O and C.

Hodowle komórek odgrywają istotną rolę w doskonaleniu metod diagnostycznych oraz produkcji szczepionek przeciwko pryszczycy. Wrażliwość komórek na zakażenie wirusem pryszczycy zależy od obecności na ich powierzchni odpowiednich receptorów (5). Posiadają je tkanki różnych gatunków zwierząt (1, 2, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13).

Celem podjętych badań było określenie optymalnych warunków wzrostu jednowarstwowych hodowli komórek: nerek, mięśnia sercowego i jąder płodów cieląt oraz nerek prosiąt i tarczycy cieląt. W drugim etapie określano wrażliwość na zakażenie wirusem pryszczycy hodowli uzyskanych bezpośrednio po trypsinowaniu tkanek oraz po przechowywaniu komórek w temperaturze  $-196^{\circ}\text{C}$ .

### Materiał i metody

Zwierzęta. Nerki, serca i jądra pochodziły od 3 – 6-miesięcznych płodów cieląt. Nerki prosiąt pobierano od zwierząt o masie około 3 kg. Tarczycę uzyskiwano od 4 – 6-miesięcznych cieląt.

Podłoża. Zastosowano 17 modyfikacji podłoży wzrostowych Hanksa, Eagle'a i Parkera. Wszystkie podłoża zawierały 30  $\mu\text{g/ml}$  gentamycyny i 25  $\mu\text{g/ml}$  amfoterycyny. Wprowadzone modyfikacje przedstawiono w tab. 1.

Hodowle komórkowe. Hodowle uzyskiwano przez trypsynowanie tkanek w temperaturze 37 lub  $4^{\circ}\text{C}$  wg ogólnie przyjętej metodyki. Komórki liczone w komorze Bürkera po zabarwieniu błękitem trypanu i określano odsetek komórek uszkodzonych. Zawiesiny w podłożach wzrostowych dzielono na dwie części: z jednej bezpośrednio po trypsinizacji zakładano hodowle komórek, drugą przeznaczano do zamrożenia w ciekłym azocie. Inkubacja odbywała się w temperaturze  $37^{\circ}\text{C}$ . Komórki tarczycy cielęcej umieszczano w cieplarni z przepływem  $\text{CO}_2$ .

Przechowywanie komórek w ciekłym azocie. Do zamrażania komórek nerek, jąder, mięśnia sercowego płodów cieląt i nerek prosiąt używano płynu Hanksa z dodatkiem 15% DMSO (Dimethyl Sulfoxide) i 15% surowicy cielęcej. Komórki tarczycy zamrażano w płynie Eagle'a z dodatkiem 15% DMSO oraz 15% surowicy płodowej. Osad komórek zawieszano w mieszaninie zamrażającej tak, aby w końcowym efekcie uzyskać około  $3 \times 10^7$  komórek/ml. Zawiesinę rozlewano do 2 ml ampulek po 1,5 ml. Ampułki umieszczano w styropianowym pudełku i przechowywano do następnego dnia w zamrażarce ( $-20^{\circ}\text{C}$ ). Następnie przenoszono do ciekłego azotu w naczyniach Dewara.

Zakładanie hodowli z komórek przechowywanych w ciekłym azocie. Po wyjęciu z ciekłego azotu ampułki wkładano do łaźni wodnej o temperaturze około  $40^{\circ}\text{C}$ . Zawartość ampułki przenoszono do probówki, rozcieńczano podłożem wzrostowym i wirowano przy 1000 obr./min. przez 5 minut. Osad komórek zawieszano w podłożu wzrostowym. Komórki ponownie liczone oraz określano odsetek komórek uszkodzonych. Hodowle zakładano na mikropłytkach, w probówkach i w butelkach Roux.

Mianowanie wirusa pryszczycy. Miano  $\text{TCID}_{50}$  wirusa pryszczycy namnożonego w nabłonku języków bydłych określano na podstawie zmian cytopatycznych w hodowlach przygotowanych z komórek bezpośrednio po trypsinowaniu tkanek oraz z komórek przechowywanych w temperaturze  $-196^{\circ}\text{C}$ . Wyniki obliczano metodą Reeda i Muencha (4) i podano w  $\log \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ .

### Wyniki i omówienie

Z danych przedstawionych w tab. 2 wynika, że najlepszy wzrost hodowli komórek nerek, jąder, mięśnia sercowego płodów cieląt oraz nerek prosiąt uzyskano stosując podłożo o składzie: płyn Hanksa z dodatkiem 10% surowicy cielęcej, 0,5% hydrolizatu laktoalbuminy i 1% buforu Hepes oraz pod-